

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Lenka Doudová**

Membránový kompartment Can1 (MCC): specializovaná funkční mikrodoména plasmatické membrány kvasinek

Membrane compartment of Can1 (MCC): specialized functional microdomain of the yeast plasma membrane

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: doc. RNDr. Jan Malínský, Ph.D.

Praha, 2017



Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.5.2017

.....  
Lenka Doudová

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Janu Malínskému, Ph.D. za čas, trpělivost a cenné rady při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kataríně Vaškovičové za podporu a čas věnovaný nejen při psaní bakalářské práce.

## Obsah

---

Abstrakt .....	6
Úvod .....	7
Kompartmentalizace plasmatické membrány u kvasinek .....	8
Membránový kompartment Can1 .....	9
MCC .....	9
Eisosomy .....	10
Biogeneze .....	13
Funkce .....	14
MCC/eisosomy jako evolučně konzervovaná struktura .....	17
Tetraspan proteiny MCC .....	20
Sur7 .....	20
Nce102 .....	23
Závěr.....	26
Použitá literatura .....	27

## Abstrakt

---

Plasmatická membrána kvasinek je rozdělena na velké množství různých kompartmentů. Membránový kompartment Can1 je specifický svým proteinovým a lipidovým složením, navíc vytváří na membráně rýhovitě invaginace. Za tyto invaginace jsou zodpovědné multiproteinové komplexy zvané eisosomy nacházející se na cytosolické straně MCC. Bylo zjištěno, že tato doména hraje důležitou roli v odpovědi na různé stresy. Sur7 a Nce102 jsou transmembránové proteiny MCC neznámé funkce. Sur7 v rámci MCC má spíše strukturní funkci, Nce102 má pravděpodobně úlohu v regulaci kináz asociovaných s MCC/eisosomy.

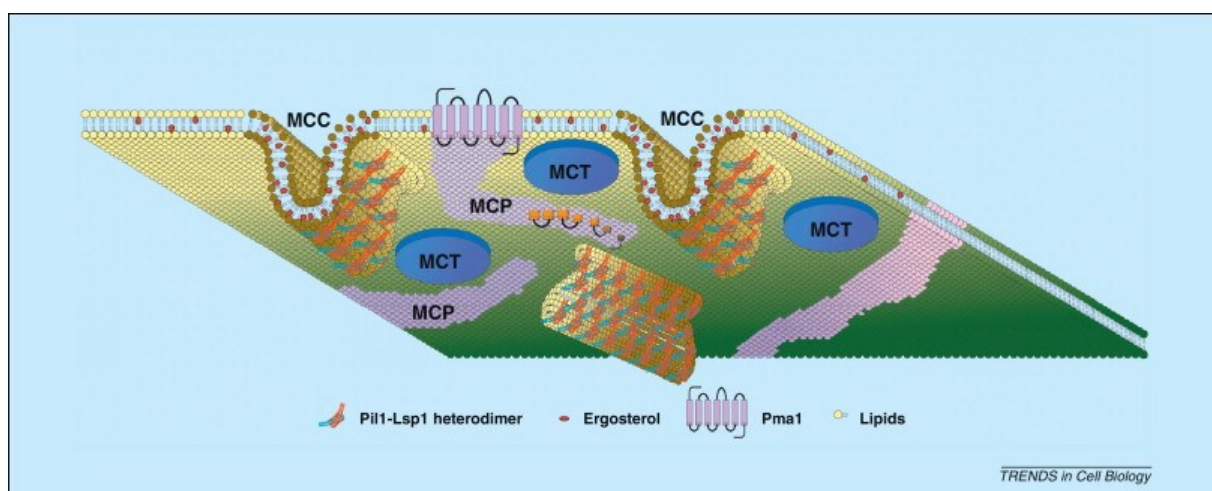
Klíčová slova: biologická membrána, membránové mikrodomény, eisosom, *S. cerevisiae*, Sur7, Nce102

Yeast plasma membrane is divided into several different compartments. Membrane compartment of Can1 is specific for its protein and lipid composition, furthermore it creates furrow-like invaginations on the plasma membrane. These invaginations are made by multiprotein complexes called eisosomes, which are located in the cytosolic side of MCCs. It was established that this domain plays an important role in response to various environmental stresses. Sur7 and Nce102 are transmembrane MCC proteins of unknown function. Sur7 is most likely a structural protein within MCC, Nce102 is probably important in regulation of kinases associated with MCC/eisosomes.

Key words: biological membrane, membrane microdomains, eisosome, *S. cerevisiae*, Sur7, Nce102

## Úvod

Plasmatická membrána kvasinek je komplexní organela hrající úlohu v mnoha buněčných dějích. Postupně se ukázalo, že je uspořádanější než se původně myslelo, skládá se z velkého množství různých kompartmentů důležitých pro různorodé funkce. Jedním z cílů této práce je shrnout současné poznatky o membránovém kompartmentu Can1 – jeho struktura, biogeneze, funkce, součástí práce je i krátký náhled na MCC/eisosomální koncept u dalších zástupců oddělení *Ascomycota*. Dalšími cíli je objasnění struktury a funkce transmembránových proteinů Sur7 a Nce102, okolo kterých přetrvává stále mnoho neznámých. Práce je zaměřená primárně na shrnutí poznatků získaných na pokusech se *Saccharomyces cerevisiae*, označením „kvasinka“, pokud není určeno jinak, je tedy myšlen právě tento modelový organismus.



Obr. 1: Model kompartmentalizace plasmatické membrány kvasinek (převzato ze souhrnného článku Ziolkowska et al., 2012)

## Kompartimentalizace plasmatické membrány u kvasinek

---

O plasmatické membráně dlouho platila představa Singerova a Nicolsonova modelu fluidní mozaiky, méně je známo, že tentýž článek popisuje i existenci membránových mikrodomén (Singer a Nicolson, 1972). Postupem času byly popisovány na membráně kvasinek různé domény specifické svým proteinovým i lipidovým složením. Počet těchto kompartmentů je vysoký, neboť se pravděpodobně všechny membránové proteiny shlukují do domén (více viz kapitola Biogeneze). Z těchto domén jsou nejlépe popsány tři: membránový kompartment Pma1 (MCP), membránový kompartment TORC2 (MCT) a membránový kompartment Can1 (MCC).

Pma1 je  $H^+$ -ATPáza plasmatické membrány kvasinek, která je homologem živočišných kationtových pump a je pro buňku esenciální (Serrano et al., 1986). Doména obsahující tuto protonovou pumpu tvoří na povrchu rozsáhlou síť, zásadně se nepřekrývá s MCC a je velmi stálá v čase (Malínská et al., 2004; Spira et al., 2012). Tento kompartment je také důležitý z důvodu generování membránového potenciálu. Pma1 je jeden z proteinů s nejdelší životností v buňce, bylo pozorováno, že se v mateřské buňce přes udrží 7—8 dělení a nepřesouvá se do buněk dceřiných (Thayer et al., 2014).

TORC2 (Target of rapamycin complex) jsou kinázy regulující metabolismus ceramidů, polymerizaci aktinu a buněčnou polaritu. Na rozdíl od TORC1 lokalizují do plasmatické membrány, kde vytváří vlastní doménu. Tato doména se nepřekrývá s MCP, ani MCC. Svým chováním se velmi odlišuje od MCP a MCC, které jsou nepohyblivé a stálé v čase. MCT je velmi dynamická struktura – pohybuje se laterálně v membráně, fúzuje a dělí se, objevuje se a mizí v časové škále desítek sekund (Berchtold et al., 2009).

Membránovému kompartmentu Can1 je věnována samostatná kapitola.



## Membránový kompartment Can1

---

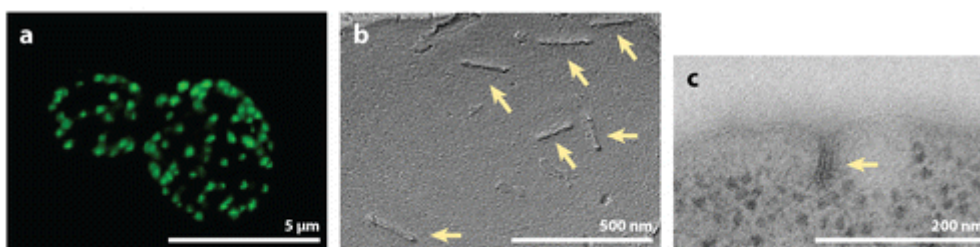
### MCC


MCC neboli membránový kompartment Can1 je nejlépe popsán membránový kompartment kvasinek. Pozorován byl už Moorem a Mühlethalerem v roce 1963 na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu jako rýhovitě invaginace plasmatické membrány, ačkoliv nikdo neznal jejich význam (Moor a Mühlethaler, 1963). Fluorescenčním mikroskopem byla nehomogenní distribuce membránových komponent pozorována poprvé u GFP značeného membránového proteinu Sur7, který tvoří na membráně shluky (Young et al., 2002). Podobná distribuce byla později pozorována i pro membránový protein Can1, podle kterého získal tento kompartment název. MCC jsou cca 300 nm velké oblasti na membráně zabírající cca 10 % povrchu, které jsou stabilní v čase (>1h) a striktně se nepřekrývají s MCP (Malínská et al., 2003, 2004). Proteiny vyskytující se v MCC se dají rozdělit do dvou skupin podle počtu (predikovaných) transmembránových domén (TMD): proteiny se 4 TMD a proteiny s 12 TMD:

Proteiny se 4 TMD, také v literatuře označované pojmy „tetraspanner“ nebo „tetraspan proteins“. Tetraspan proteinů se v MCC nachází dvě rodiny. Všechny tyto proteiny mají predikovanou strukturu vyznačující se přítomností čtyř transmembránových helixů. První z nich je Sur7 rodina, do které patří Sur7, Fmp45, Pun1 a Ynl194c (Sivadon et al., 1997; Alvarez et al., 2008). Sur7 je v rámci MCC velmi stabilní (Young et al., 2002; Grossmann et al., 2007), často se používá jako jejich marker. Druhá rodina je Nce102 rodina a patří do ní dva proteiny: Nce102 a Fhn1 (Grossmann et al., 2008; Loibl et al., 2010). Hlavním zástupcům obou rodin budou věnovány samostatné kapitoly.

Proteiny s 12 TMD jsou H<sup>+</sup> symportery pro živiny, v asociaci s MCC byly nalezeny: výše zmíněný Can1 – permeáza pro arginin, Fur4 – pro uracil a Tat2 – pro tryptofan a tyrosin (Malínská et al., 2003, 2004; Grossmann et al., 2007). Všechny tyto permeázy vytvářejí velké shluky, ačkoliv ne všechny jejich molekuly se vyskytují exkluzivně v MCC, část transportérů je rozptýlena i po zbytku plasmatické membrány (Brach et al., 2011). Pro pozorování změn v MCC byl také používán HUP1. HUP1 je protonový symporter pro hexózy pocházející z jednobuněčné řasy *Chlorella kessleri*. Chová se obdobně jako MCC permeázy *S. cerevisiae*, ale není rozpoznávána endocytickým aparátem buňky a zůstává na membráně, takže může sloužit jako citlivý marker (Grossmann et al., 2007, 2008). Pokusy bylo zjištěno, že množství

molekul permeáz v MCC závisí na membránovém potenciálu. Při depolarizaci plasmatické membrány nebo nadbytku substrátu dojde k jejich vyputování ze shluků a rovnoměrnějšímu rozprostření po celé ploše membrány. Repolarizací se permeázy opět začnou shlukovat do původního vzoru, tento jev je tedy vratný (Grossmann et al., 2007). Barvení filipinem (fluorescenční barva, která interaguje s 3'- $\beta$ -hydroxysteroly) ukázalo, že se v MCC hromadí ergosterol, hlavní kvasinkový sterol (Grossmann et al., 2007). Ergosterol by se mohl pohybovat spolu s permeázami v závislosti na polarizaci plasmatické membrány, této teorii nasvědčuje několik faktů (Grossmann et al., 2007). V ergosterolových mutantech je funkčnost permeáz výrazně snížena (Malínská et al., 2003), dalším faktem je, že HUP1 vždy kopurifikuje s několika molekulami ergosterolu (Robl et al., 2000), což ukazuje, že permeázy potřebují prostředí bohaté na ergosterol.



 Douglas LM, Konopka JB. 2014.  
Annu. Rev. Microbiol. 68:377–93

Obr. 2: a – shluky Sur7-GFP na plasmatické membráně; b (pohled shora), c (řez) – šipky ukazují na rýhovitě invaginace v plasmatické membráně (převzato ze souhrnného článku Douglas a Konopka, 2014)

## Eisosomy

Eisosomy jsou multiproteinové komplexy na cytosolické straně MCC. Svě jméno získaly z řeckého „eis“ (portál, vstup) a „soma“ (tělo), neboť se původně myslelo, že jsou místy endocytózy (Walther et al., 2006). Eisosomální proteiny jsou zodpovědné za pozorovatelné 200-300 nm dlouhé a 50 nm hluboké invaginace plasmatické membrány. Jejich počet je závislý na velikosti povrchu buňky, v průměru bylo spočítáno asi 2,5 invaginace na  $\mu\text{m}^2$  (Strádalová et al., 2009). Nebyl pozorován pohyb eisosomů, ani jejich dělení, na membráně jsou rozmístěny náhodně (Walther et al., 2006; Moreira et al., 2009). Velikost eisosomů je do jisté míry variabilní, jednou z limitací je množství Pil1, solubilního proteinu, který je pro formování eisosomu nezbytný. Až SRAP (single molecule recovery after photobleaching)

analýza ukázala, že eisosomy, ačkoliv jsou to velmi stabilní struktury, si vyměňují podjednotky s cytoplasmatickými proteiny na koncích Pil1 vláken (Lacy et al., 2016). Díky své stabilitě se podobají centrozomům, tudíž by se daly považovat za organelu (Walther et al., 2006).

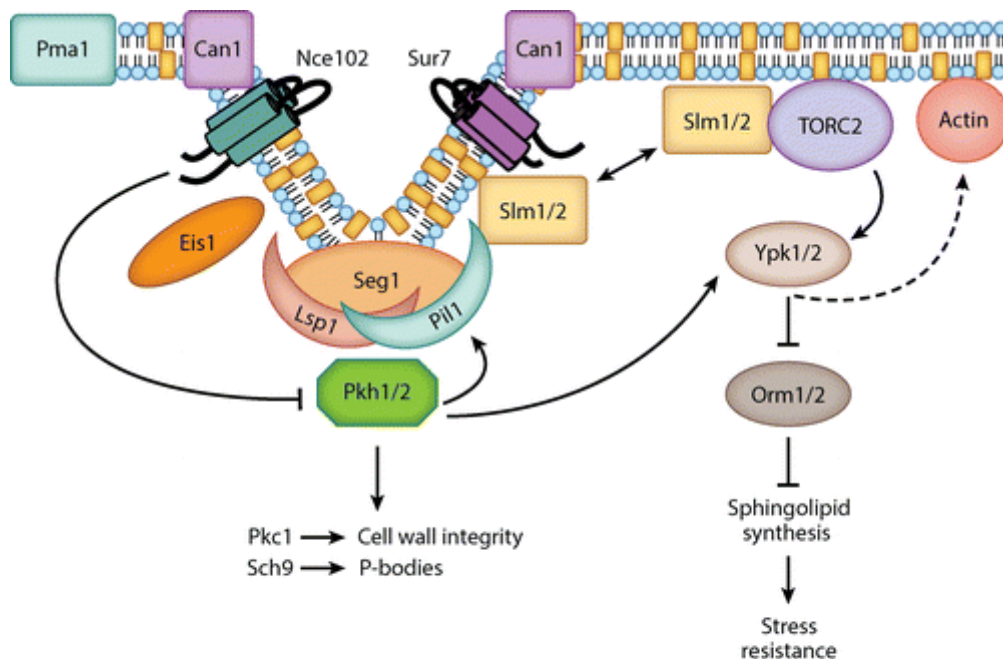
Pil1 a Lsp1 jsou s výskytem přes 100 000 molekul každého z obou proteinů nejpočetnějšími eisosomálními komponenty (Ghaemmaghami et al., 2003). Tvoří dimery, které se skládají do filamentárních struktur a vytváří proteinové lešení po celé ploše invaginace. Pil1 a Lsp1 jsou zodpovědné za typický hemitubulární tvar eisosomů (Olivera-Couto et al., 2011; Karotki et al., 2011). Na snímcích z elektronového mikroskopu byl značený Pil1 nalezen ve spodní části invaginace (Strádalová et al., 2009). Oba proteiny patří do Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) proteinové superrodiny. Ačkoliv nemají žádnou transmembránovou doménu, ani lipidovou kotvu, vazbu k membráně a její ohýbání jim dovoluje jejich srpkovitý tvar a přítomnost kladně nabitých aminokyselin (Arg, Lys) v BAR doméně (Olivera-Couto et al., 2011), pomocí které se vážou na membránový PI(4,5)P<sub>2</sub>. Absence kladných zbytků nebo PI(4,5)P<sub>2</sub> znemožní vazbu Pil1 k membráně, a tedy i vznik eisosomů, nadbytkem PI(4,5)P<sub>2</sub> vznikají naopak velké struktury vystupující do cytoplasmy. K interakci s membránou slouží i N-konec proteinů (Karotki et al., 2011). Ačkoliv Pil a Lsp1 jsou paralogy se sekvenční podobností 72 % (Walther et al., 2006; Olivera-Couto et al., 2011), jejich vliv na fenotyp se výrazně liší. Delecí *LSP1* nedojde k pozorovatelné změně fenotypu, kdežto delecí *PIL1* dojde k řadě změn. Při absenci Pil1 neodkáže Lsp1 nahradit jeho funkci, zůstává z velké části v cytoplasmě. Také se úplně rozruší MCC/eisosomální kompozice. MCC a eisosomální proteiny jsou rovnoměrněji rozprostřeny po ploše membrány s výjimkou několika abnormálních velkých invaginací, v literatuře nazývaných „eisosome remnants“. V těchto remnants se hromadí jednak eisosomální proteiny, tak i MCC komponenty (Can1, Sur7, ergosterol) (Walther et al., 2006; Grossmann et al., 2007).


Na Pil1 a Lsp1 se vážou další eisosomální proteiny. Slm1/2 jsou homologní proteiny vyskytující se převážně v MCC, ale částečně lokalizují i do MCP (Kamble et al., 2011). V buňce mají řadu různých funkcí. Slouží jako substrát pro TORC2 komplex, regulují dynamiku aktinového cytoskeletu, dále mají vliv na buněčný růst a metabolismus sfingolipidů. (shrnuto v Olivera-Couto et al., 2011). Slm proteiny mají dvě domény sloužící pro vazbu k membráně, PH (pleckstrin homology, slouží k vazbě k fosfatidylinositolům) a BAR domény. Pro vazbu k membráně stačí pouze PH doména, ale pro vazbu do eisosomů je nutná spolupráce obou domén (Olivera-Couto et al., 2011). Přítomnost alespoň jednoho z homologů v buňce je nezbytná pro správnou lokalizaci Pil1 do eisosomů (Kamble et al., 2011).

Seg1 je eisosomální protein interagující s Pil1, Lsp1, dalšími eisosomálními proteiny Eis1/Ymr031c a Ygr130c, a se svým paralogem Seg2/Ykl105c. Množství Seg1 v buňce je asi 10× menší než Pil1. S lipidy plasmatické membrány interaguje C-terminální doménou. Ovlivňuje počet a tvar (délku) eisosomů. Seg1 je důležitý pro správnou inkorporaci Pil1 do eisosomů, jeho delecí nedojde k vymizení invaginací, fenotyp se projeví pouze snížením jejich počtu. Delece paralogu Seg2 má na fenotyp jen nepatrný vliv, to je pravděpodobně zapříčiněno nízkou hladinou proteinu v buňce (10× méně než Seg1). Overexpresí Seg1 dojde k prodloužení eisosomů a ke vzniku tyčkovitých, v literatuře označovaných „rod-like“, struktur. Tyto struktury obsahují eisosomální komponenty jako Pil1, Lsp1 a ergosterol. Overexprimovaný Seg1 v *Δpil1* buňkách se také shlukuje do tyčkovitých struktur obsahujících Lsp1 s tím rozdílem, že se v nich nehromadí ergosterol. Toto poukazuje na skutečnost, že Pil1 a Seg1 mají roli v rozdílných krocích vzniku eisosomů. Snímky z elektronového mikroskopu bylo ověřeno, že tyčkovité struktury nejsou náhodné agregáty, ani remnants, ale neobvykle dlouhé, avšak jinak normální rýhy (cca 2× delší než wt). V *Δpil1* buňkách byly pozorované rýhy širší a výrazně hlubší. Seg1 byl v těchto invaginacích pozorován u jejich hrdla, což by mohlo ukazovat na roli v ohýbání membrány směrem dovnitř. U *Schizosaccharomyces pombe* byl nalezen protein Sle1/SPAC1A6.07 (Seg1-like eisosome protein 1) s podobnými vlastnostmi jako Seg1, což ukazuje na evoluční konzervovanost (Moreira et al., 2012).

Pkh1/2 kinázy jsou serin-threoninové kinázy, které jsou funkčními homology savčí PDK1 (fosfoinositid-dependentní kináza; Casamayor, 1999). Interagují s Ypk1/2, Sch9, Pkc1 kinázami a podílí se na řadě funkcí zahrnujících například odpovědi na různé vnější stresy, endocytózu a vznik a rozpad eisosomů (shrnuto v Fröhlich et al., 2009). Obě kinázy alespoň částečně kolokalizují s eisosomy a pravděpodobně i s eisosomálními remnants. Pkh1 potřebuje pro svou lokalizaci do eisosomů přítomnost Pil1, kdežto Pkh2 je na Pil1 nezávislá. Jedním z jejich cílů jsou Pil1 a Lsp1, tedy hlavně Pil1, které fosforylují *in vitro* i *in vivo*. Fosforylace hraje roli v lokalizaci eisosomů do MCC. Buňky s absencí funkčních Pkh kináz mají méně eisosomů, které mají méně uniformní velikost, nejsou rovnoměrně rozmístěny a některé zdánlivě fúzíjí a vytvářejí masy větší než normální eisosomy. Aktivita Pkh kináz je regulována LCB (long-chain bases, metabolické prekurzory sfingolipidů). Jejich vyšší koncentrace v membráně vede ke zvýšení množství Pil1 v eisosomech. (Walther et al, 2007). Pkh kinázy však pravděpodobně přímo neinteragují s LCB, jako prostředník zde působí MCC protein Nce102 (Fröhlich et al., 2009). Přes Ypk1/2 kinázy LCB-Pkh1/2 signální dráha reguluje stabilitu a rozpad eisosomů (Luo et al., 2008).

Celkově bylo identifikováno přes 20 MCC/eisosomálních proteinů (Grossmann et al., 2008). O některých se stále neví mnoho, včetně jejich vlivu na fenotyp a roli v rámci MCC/eisosomů. Pro objasnění jejich funkce budou třeba další studie.



 Douglas LM, Konopka JB. 2014.  
Annu. Rev. Microbiol. 68:377–93

Obr. 3: Model MCC/eisosomální domény u *Saccharomyces cerevisiae* (převzato ze souhrnného článku Douglas a Konopka, 2014)

## Biogeneze

O biogenezi MCC/eisosomů se toho stále ještě mnoho neví, ani jak je vybíráno místo vzniku, ani přesný sled událostí. Bylo zjištěno, že všechny, nebo alespoň většina, transmembránových proteinů není na kvasinkové membráně rozmístěna homogenně, nýbrž tvoří velké množství různých domén. Tento jev je možný díky pomalé laterální difuzi integrálních proteinů a rychlejšímu pohybu proteinů s lipidovou kotvou, tímto vznikají na membráně různé vzory od malých shluků po velké síťovité domény. Tyto domény se více nebo méně překrývají, s výjimkou MCC, do kterého mají ostatní proteiny, až na zjištěné MCC komponenty, přístup zakázán. Rozložení proteinů do domén není náhodný jev, proteiny se stejnou nebo podobnou sekvencí spolu spíše kolokalizují než proteiny výrazně rozdílné, toto platí zejména pro jejich transmembránové helixy. Na lokalizaci proteinů do domén nemá

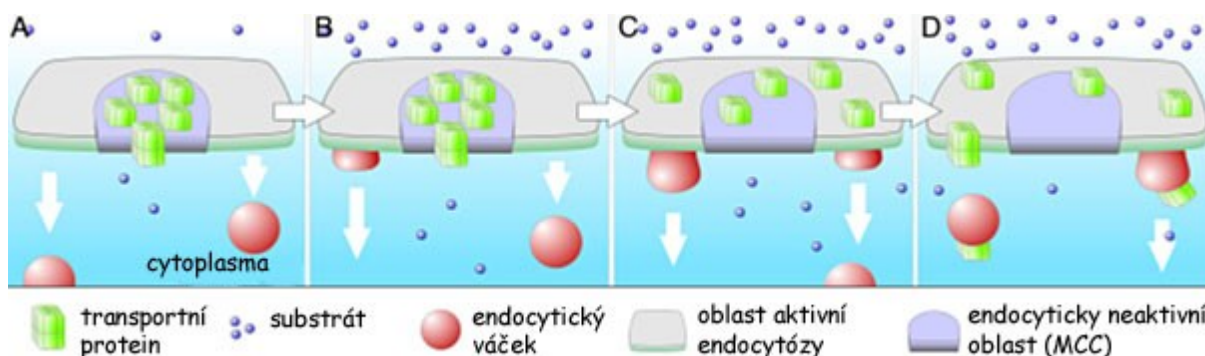
téměř žádný vliv přítomnost aktinu, s výjimkou endocytických domén. Buněčná stěna má vliv na lokalizaci do domén pouze u některých proteinů, k největším změnám dojde při změně lipidového složení membrány. Výskyt proteinu v membránové doméně může mít vliv na jeho funkci. Přesný mechanismus vzniku těchto domén, tedy i MCC, není znám (Spira et al., 2012).

Faktů o vzniku eisosomů je známo také poměrně málo. Vznikají *de novo* v dceřiných buňkách, v malých pupenech chybí, začínou se skládat až po překročení kritické velikosti pupenu, což je 17  $\mu\text{m}^2$ . Na nové buňce se objevují postupně ve vlně směrem od mateřské buňky. Na mateřské buňce nevznikají pouze ve výjimečných případech jako například inkubace s nocodazolem, který způsobí zvětšení plochy membrány (Moreira et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že Nce102 je v malých pupenech rozmístěn homogenně, teprve poté, co pupen dosáhne zhruba třetiny velikosti mateřské buňky, se začne koncentrovat do shluků (Grossmann et al., 2008). Seg1, organizátor eisosomů, se vyskytuje v malých pupenech nezávisle na jejich velikosti. Je tedy součástí jejich prekurzorů, kde tvoří volné shluky, které jsou následně stabilizovány Pil1/Lsp1 (Moreira et al., 2012).

Na inkorporaci Pil1 do eisosomů má vliv fosforylace proteinu, za tu jsou zodpovědné Pkh kinázy. Fosforylací Pil1 se zabývalo více studií, které došly k rozdílným názorům. Walther et al. představili model, kdy fosforylace Pil1 vede k rozpadu eisosomů, kdežto Luo et al. tvrdí, že fosforylace naopak podporuje vznik eisosomů. Rozdílné výsledky mohl způsobit odlišný design experimentů, kde obě skupiny mutovaly jiná fosforylační místa. Dalším vysvětlením by mohl být i vliv dalších drah ovlivňující fosforylací Pil1 (Walther et al., 2007; Luo et al., 2008; Fröhlich et al., 2009).

## Funkce

Původně byly eisosomy považovány za místa, kde probíhá endocytóza, podle čehož získaly i své jméno. V těchto pokusech způsobila absence Pil1 snížení endocytózy (Walther et al., 2006). Toto bylo ovšem vyvráceno, neboť další studie ukázaly, že endocytóza probíhá výhradně mimo MCC. Důvodem by mohla být pouhá sterická zábrana způsobená eisosomálními proteiny. Výběr míst klasické endocytózy se zdá být víceméně náhodný, kromě MCC se také např. vyhýbá místům, kde se potkává kortikální endoplasmatické retikulum s plasmatickou membránou (Brach et al., 2011; Strádalová et al., 2012). Permeázy asociované s MCC jsou při nadbytku živin rozptýleny homogenněji po membráně a zároveň jsou rychleji endocytovány (Brach et al., 2011, Grossmann et al., 2008).



Obr. 4: Při nedostatku substrátu jsou transportéry nahromaděny v endocyticky neaktivní oblasti (A), přidáním nadbytku substrátu (B) jsou transportéry uvolněny z MCC (C) a stávají se předmětem endocytózy (D). (převzato z Grossmann *et al.*, 2008)

Toto pozorování naznačuje, že endocyticky neaktivní MCC by mohly, při nedostatku některých živin, bránit předčasné endocytóze permeáz za nepříznivých podmínek (Obr. 4; Grossmann *et al.*, 2008).

Umístění eisosomů na vnitřní straně cytoplasmatické membrány jim dává strategickou pozici, díky které mohou efektivně reagovat na změny vnějšího prostředí. Jako spojka mezi eisosomy a buněčným stresem pak fungují Pkh1/2-Ypk1/2 kinázy (Luo *et al.*, 2008).

Eisosomy rovněž hrají důležitou roli v odpovědi na osmotický stres. Pokusy prováděné na protoplastech dělicích se kvasinek (*Schizosaccharomyces pombe*) a na pučících kvasinkách (*Saccharomyces cerevisiae*) ukázaly, že při hypoosmotickém šoku dojde k rychlé expanzi plasmatické membrány a zvětšení buňky. U buněk s deletovaným *PILI*, tedy bez eisosomů, k žádnému velkému pozorovatelnému efektu nedojde. Expanze membrány je tedy možná díky rozpadu eisosomů, což ukázaly i snímky z elektronového mikroskopu. Mechanismus jevu se však u těchto dvou typů kvasinek liší. U pučících kvasinek odpověď probíhá pomocí Slm1, u dělicích se kvasinek tento protein vůbec nelokalizuje do eisosomů a ani jeho absence v buňce nemá vliv na sledovaný fenotyp. U buněk s buněčnou stěnou nedochází k rozpadu eisosomů, pevná buněčná stěna pravděpodobně nedovolí buňce zvětšit svou velikost. Tento mechanismus je velmi podobný s živočišnými caveolami (Kabeche *et al.*, 2015).

Odpovědi na hyperosmotický stres by se eisosomy mohly také účastnit. Při náhlém velkém hyperosmotickém šoku jsou na buňkách pozorovatelné větší invaginace oproti běžnému fenotypu. Tyto invaginace by mohly být zvětšené eisosomy, do kterých byla přidána přebytečná membrána po zmenšení buňky. Tuto teorii podporuje i fakt, že shluky Sur7 se nachází blíže sobě než u wt buněk. Postupnou dehydratací dochází k jiným jevům. Na plasmatické membráně vzniká méně, ale větších záhybů stočených zpět k membráně



a dochází k delokalizaci MCC proteinů (pozorováno pro Sur7). Postupnou rehydratací dochází k rozvinování membrány, MCC se sice obnoví, ale až po určitém časovém úseku. Přesný mechanismus tohoto jevu není znám (Dupont et al., 2010).

Podobně jako osmotická dehydratace má vliv na plasmatickou membránu i vysoušení na vzduchu. Vzhledem k tomu, že se v přírodě kvasinky nevyskytují ve stabilních atmosférických podmínkách, je pro ně schopnost adaptace životně nezbytná. Životaschopnost buněk po skokové dehydrataci a následné rychlé rehydrataci je velmi malá, výrazně se zvýší, pokud oba procesy probíhají postupně. Pozorováním změn na plasmatické membráně pomocí Sur7-GFP ukázalo, že po šokové dehydrataci se jeho distribuce na membráně nemění, kdežto postupnou dehydratací dojde na většině buněk k rovnoměrnější distribuci Sur7-GFP a vzniku méně větších shluků, tento pozorovaný vzor je podobný jako při pozorování osmotické dehydratace (Dupont et al., 2010), ale v detailech se liší. Rychlou rehydratací po šokové dehydrataci byl protein pozorován v cytoplasmě, což bylo pravděpodobně zapříčiněno lyzí buněk. Při postupné rehydrataci po pomalé dehydrataci se značený protein vrátil do normálního MCC vzoru (Lemetais et al., 2012). Chování buněk při vysoušení bylo velmi podobné chování buněk při pokusech s dehydratací v tekutém médiu prováděných Dupont et al., 2010 (viz výše), což ukazuje, že vliv přítomnosti kyslíku (a tedy oxidativní poškození) při vysoušení na vzduchu má na buňku jenom malý vliv oproti osmotické dehydrataci v tekutém médiu (Lemetais et al., 2012).

Eisosomy také hrají roli v udržení hladiny fosfoinositidů v plasmatické membráně. Bylo zjištěno, že PI(4,5)P<sub>2</sub> fosfatáza Inp51/Sjl1 (synaptojanin-like protein 1) lokalizuje do eisosomů, kde interaguje s Pil1, který je nezbytný pro její lokalizaci – v jeho absenci se hladina PI(4,5)P<sub>2</sub> zvýší – dále pak interaguje s eisosomálními proteiny Lsp1, Eis1, Seg1, Msc3 a Ygr130c. Mechanismus regulace fosfoinositidů v membráně není znám, ale rekrutování Inp51 do eisosomů značí, že by mohly mít i důležitou roli v homeostáze lipidů (Fröhlich et al., 2014). PI(4,5)P<sub>2</sub> hraje roli při osmotickém stresu u *Schizosaccharomyces pombe*. Eisosomy fungují s fosfatázou Syj1 proti PI 5-kináze Its3 a tím negativně regulují aktivaci Pmk1. Pmk1 je kináza konzervované MAP kinázové kaskády nazývané dráha buněčné integrity (cell integrity pathway), která zajišťuje odpověď na různé environmentální podmínky. Při osmotickém stresu také dochází ke vzniku kortikálních klastrů PI(4,5)P<sub>2</sub> na hranicích eisosomů, které se s eisosomy nepřekrývají. Do těchto klastrů lokalizuje Its3 a je nezbytná pro jejich vznik. Navíc se zdá, že tyto klastry jsou konzervovanou záležitostí, byly nalezeny i u pučících kvasinek (Kabeche et al., 2015).



Další ze zjištěných funkcí eisosomů je regulace degradace mRNA. Xrn1/Kem1 je od hub po savce evolučně konzervovaná 5'-3' exoribonukleáza štěpící mRNA po odstranění 5' čepičky. Lokalizuje do P-tělísek (processing bodies). P-tělíska jsou ribonukleoproteinové shluky mající úlohu ve skladování a degradaci mRNA (shrnutí v Grousl et al., 2015). Pokusy bylo zjištěno, že lokalizace Xrn1 se v buňce mění v závislosti na množství glukózy v médiu. Zpočátku, při dostatečném množství glukózy se enzym vyskytuje rovnoměrně v cytoplasmě, s postupným spotřebováváním glukózy se přesouvá do P-tělísek a po spotřebování glukózy (post-diauxické buňky) se přesouvá do eisosomů. Při akutním stresu z nedostatku glukózy se Xrn1 do eisosomů nepřesune. Pro lokalizaci Xrn1 do MCC/eisosomů je nezbytná jak přítomnost Pil1, tak i přítomnost Sur7, který oproti Pil1 nemá pro vznik a udržení eisosomů výraznou roli. Přidání glukózy k post-diauxickým buňkám vedlo k vrácení Xrn1 zpět do P-tělísek a cytoplasmy, kdežto přidání nefermentovatelného zdroje uhlíku nevedlo ke změně lokalizace Xrn1. Fyzická separace Xrn1 od zbytku mRNA degradujících proteinů může mít fyziologický význam, neboť část mRNA skladovaná v eisosomech může být při změně podmínek opět vrácena pro translaci (Grousl et al., 2015). Vznik P-tělísek a rozpad mRNA, konkrétně deadenylační krok, reguluje Pkh1/2-Pkc1 signální kaskáda, která začíná v eisosomech. Tato regulace funguje pouze u buněk rostoucích v médiu, kde chybí některé živiny, což ukazuje na souvislost mezi dostupností živin a degradací mRNA (Luo et al., 2011).

### MCC/eisosomy jako evolučně konzervovaná struktura

Eisosomy jako útvar na plasmatické membráně se zdají být evolučně velmi konzervovány. Invaginace plasmatické membrány můžeme najít u různých organismů od bakterií, přes zelené řasy, houby až po vyšší rostliny (shrnutí v Strádalošová et al., 2009). Je důležité studovat tyto útvary u každého organismu zvlášť, neboť se často liší složením komponentů a v případě homologů často i funkcí.

Eisosomy jsou také poměrně intenzivně zkoumány u zástupce dělicích se kvasinek *Schizosaccharomyces pombe* (*Taphrinomycotina*). Jeden z nejnapadnějších rozdílů od *S. cerevisiae* je velikost jejich eisosomů – 1-2  $\mu\text{m}$  oproti 200-300 nm. Podobně jako u pučících kvasinek se nevyskytují v zónách buněčného růstu, hlavní eisosomální komponenty obou typů kvasinek ScPil1 a SpPil1 jsou funkčními homology, které nepotřebují ke svému skládání do vláken cytoskelet. Pil1 vlákna jsou velmi stálá, dynamikou podobná těm u *S. cerevisiae*. Pil1 (Kabeche et al., 2011; Lacy et al., 2016). Při buněčném dělení

dochází k růstu buňky uprostřed a vyklizení této zóny od Pil1 filamentů. Děje se tak nejen rozpadem, ale také pohybem eisosomů, což u *S. cerevisiae* zatím nikdy pozorováno nebylo. U orthologů Slm1 (SPAC637.13c) a Sur7 (SPAC15A10.09c) nebyla zjištěna kolokalizace s Pil1, ani tyto proteiny nepotřebují Pil1 pro jejich správnou lokalizaci, v buňkách dělicích kvasinek se vyskytují na pólech. Fhn1, funkční homolog Nce102, se vyskytuje nejen v MCC/eisosomech, ale i na pólech rostoucích buněk a je nezbytný pro vznik Pil1 filament. Overexprimovaný Pil1 vytváří stabilní tyčkovité struktury plovoucí v cytoplasmě, často dlouhé přes celou buňku (Kabeche et al., 2011).

Byly prováděny pokusy, jejichž cílem byl import kompozičně a morfologicky stejných *S. pombe* eisosomů do membrány *S. cerevisiae* expresí některých eisosomálních komponentů. Exprese SpPil1 v wt buňkách *S. cerevisiae* vedla pouze ke slabé inkorporaci tohoto proteinu do eisosomů, kdežto v  $\Delta pil1$  buňkách byl SpPil1 schopen částečně napravit fenotyp včetně organizace MCC/eisosomálních proteinů. SpSle1 je funkční protějšek Seg1, ačkoliv spolu sdílí jen velmi malou sekvenční identitu, nedají se tedy považovat za homology. SpSle1 není schopen při absenci Seg1 organizace MCC/eisosomů v membráně *S. cerevisiae*, navíc vytváří nové mikrodomény, které nekolalizují s Pil1. SpSle1 pomáhá SpPil1 s asociací k membráně, navíc tyto dva proteiny v  $\Delta pil1$  buňkách vytváří eisosomy tvarem více podobné těm u *S. pombe*. Také jsou schopné do těchto eisosomů organizovat ostatní MCC/eisosomální komponenty včetně Seg1 a při nízké hladině SpPil1 vznikají remnants. Toto ukazuje, že oba eisosomální organizéry jsou schopny spolupracovat na vzniku eisosomů, přičemž SpPil1 může být stabilizován Seg1, i když SpSle1 jej stabilizuje efektivněji. Elektronová mikroskopie ukázala, že invaginace vzniklé expresí SpPil1 v  $\Delta pil1$  buňkách jsou mělčí než ve wt buňkách, koexpresí SpPil1-SpSle1 vzniknou invaginace strukturně podobné těm u *S. pombe* (Vaškovičová et al., 2014).

Eisosomální koncept byl zkoumán též na vláknité houbě *Aspergillus nidulans* (*Pezizomycotina*). Byly nalezeny homology Pil1 a Lsp1 – PilA a PilB. U *S. cerevisiae* tyto proteiny kolokalizují po většinu životního cyklu, v *A. nidulans* PilA a PilB kolokalizují pouze v konidiích. Eisosomy jako takové můžeme u *A. nidulans* pravděpodobně najít pouze u askospor, kde s PilA a PilB také kolokalizuje SurG, ortolog Sur7. Tyto eisosomy se nachází blíže u sebe než u *S. cerevisiae* a zdá se, že se dotýkají, takže se nedají spočítat. PilA také vytváří shluky na hyfech v myceliu, ale PilB se nachází v cytoplasmě a SurG se nachází ve vakuolách a endosomech. ScPil1 je nezbytný pro vznik eisosomů, kdežto absence PilA nemá na lokalizaci PilB významný efekt, lokalizace PilB je ovlivněna SurG. Tedy i přes velkou

podobnost s MCC/eisosomálními komponenty *S. cerevisiae*, funkce a interakce homologů u *A. nidulans* se liší (Vangelatos et al., 2010).

*Ashbya gossypii* je vláknitá houba patřící do pododdělení *Saccharomycotina*. I přes její blízkou příbuznost se *S. cerevisiae* postrádá některé homology MCC/eisosomálních komponentů. Eisosomy se pravděpodobně hlavně vytváří v brzkých vývojových stádiích a později je jejich vznik značně omezen na rychle rostoucí hyfy. Navíc jejich rozmístění na membráně není rovnoměrné jako u *S. cerevisiae*, jejich hustota rozmístění kolísá v závislosti na fázi životního cyklu, největší koncentraci lze najít na sporách, nejnižší ve starších hyfech. Toto ukazuje, že jejich počet není závislý na velikosti povrchu, jako je tomu *S. cerevisiae*. Tyto eisosomy se také vyznačují stálostí, ale zdá se, že ve starších hyfech se jejich koncentrace lehce zvyšuje a průměrná velikost zmenšuje, což by mohlo naznačovat, že se eisosomy přestavují. *AgPil1* má důležitou úlohu v polarizaci růstu a jeho absence navíc způsobuje abnormální tvary hyf. *A. gossypii* má pouze jeden homolog *ScNce102*, jehož absence nemá na vznik eisosomů žádný vliv. Na této houbě byl zkoumán protein kódovaný genem *ABL037c*, který se ukázal jako důležitý protein pro stabilizaci eisosomů – *AgSeg1* (stabilizer of eisosome in *gossypii*), který zastává obdobnou funkci jako homologní *Seg1* u *S. cerevisiae* (Seeger et al., 2011).

MCC-eisosomy v plasmatické membráně patogenní kvasinky *Candida albicans* (*Saccharomycotina*) jsou studovány nejvíce v rámci vývoje nových potenciálních antifungálních léčiv (více viz kapitola Sur7).

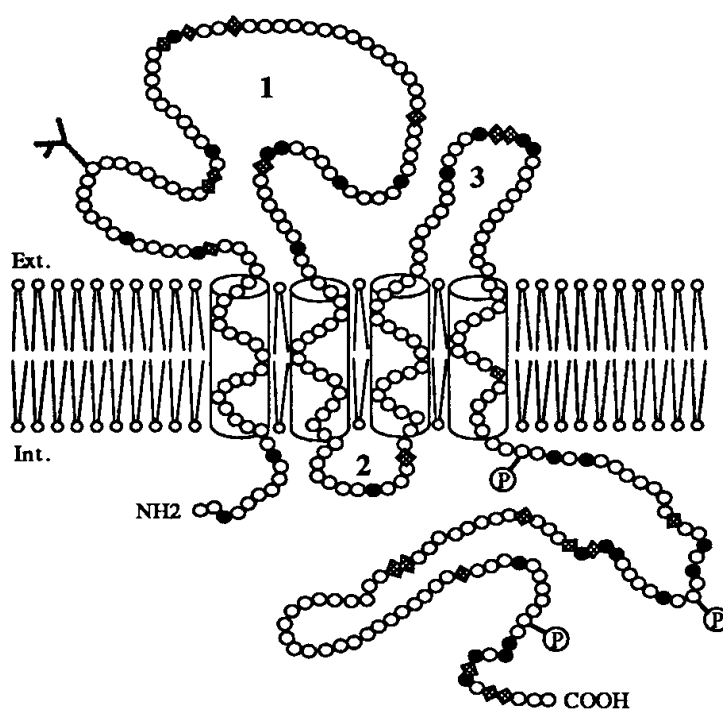
## Tetraspan proteiny MCC

Sur7 a Nce102 jsou MCC proteiny, jejichž funkce není stále plně objasněna. Tato kapitola bude věnována shrnutí poznatků dosud získaných o strukturách a funkcích obou těchto proteinů.

### Sur7

Sur7 (supressor of rvs167 mutation) je 302 aminokyselin dlouhý a 33,83 kDa velký MCC protein ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) s četností cca 17000 molekul proteinu na buňku (Ghaemmaghami et al., 2003). Podobně jako Pma1 patří mezi proteiny s nejdelší životností (Thayer et al., 2014)

Sur7 se řadí mezi tetraspan proteiny, neboť na základě analýzy hydropatického profilu má predikovány čtyři transmembránové helixy. Tento model také předpovídá dvě velké extracelulární smyčky, N a C konce jsou orientovány do cytosolu, navíc C koncová intracelulární doména je dlouhá a obsahuje fosforylovatelné aminokyseliny, které by mohly



Obr. 5 : Schéma předpokládané struktury Sur7, bílá kolečka – aminokyselinové zbytky, černá kolečka – bazické zbytky, kosočtverce – kyselé zbytky; 1,2,3 – smyčky; P – místa možné fosforylace; –Y v první extracelulární smyčce – místo možné glykosylace; válce – transmembránové domény (převzato z Sivadon et al., 1997)

být substrátem pro kinázy. Toto uspořádání by proteinu umožňovalo se angažovat v intracelulárních i extracelulárních interakcích (Sivadon et al., 1997). Přesné prostorové uspořádání proteinu však není známo.

Jak už jeho název napovídá, Sur7 je supresor *Arvs161 a Arvs167* fenotypu. Rvs161 a Rvs167 jsou proteiny interagující s aktinem a jsou důležité pro jeho organizaci. Overexprimovaný Sur7 dokáže částečně napravit fenotyp v *Arvs161 a Arvs167* buňkách, umožní jejich lepší růst v na živiny chudých médiích nebo vysokých koncentracích soli, také částečně navrací organizaci aktinu a bipolární vzor pučení, který je jinak v *Arvs* buňkách náhodný (Sivadon et al., 1997).

Do Sur7 proteinové rodiny patří ještě proteiny Ynl194c, Ydl222/Fmp45 a Pun1/Ylr414 (Young et al., 2002; Grossman 2008; Alvarez et al., 2008). Ynl194 je paralogem Fmp45, vznikl celogenomovou duplikací ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Ačkoliv Pun1 sdílí se Sur7 nižší sekvenční identitu než ostatní proteiny z rodiny (cca 20 %), strukturně se od nich pravděpodobně příliš neliší (Alvarez et al., 2008). Delecí Sur7 nedojde k žádnému výraznému fenotypu, stejně jako Fmp45 není pro buňku esenciální. Sivadon et al. (1997) naznačili, že Ynl194c by mohl být pro buňku esenciální, další studie však toto pozorování ale nepotvrdily. Nabízené vysvětlení říká, že za rozdílné výsledky by mohly být zodpovědné možné změny v genetickém pozadí (Sivadon et al., 1997; Young et al., 2002). Další odlišností Ynl194 od Sur7 je to, že overexprese Ynl194 nedokáže napravit *Arvs* fenotyp (Sivadon et al., 1997).

Pozorováním fluorescenčně značeného Sur7 bylo zjištěno, že tento protein vytváří na plasmatické membráně shluky, ve kterých proteiny Sur7 rodiny kolokalizují (Young et al., 2002; Grossmann et al., 2008). Tyto shluky byly v místě a čase stálé a nevyskytovaly se v malých pupenech, pro svou lokalizaci nepotřebovaly aktinový cytoskelet (Malínská et al., 2003). Inkubace se zymolýzou nezpůsobila rozpad těchto shluků, ale delší inkubace s glukuronidázou (pro úplné odstranění buněčné stěny) způsobila rozpad většiny pozorovaných shluků, což značí, že lokalizace Sur7 do jisté míry závisí na extracelulárních interakcích (Malínská et al., 2004). V porovnání se Sur7 jsou homologní Fmp45, Ynl194 a Pun1 vzhledem k jejich malé četnosti v buňce hůře pozorovatelné. Pro tvorbu shluků proteinů Sur7 rodiny v plasmatické membráně je důležitá N-terminální třetina jejich molekuly. Tyto proteiny hrají roli při sporulaci, při níž se nacházejí ve shlucích na vnější membráně vřeka. Na membránách nových askospor nebyly detekovány, jejich přesná úloha je však neznámá. Dále pak tyto proteiny mají vliv na množství sfingolipidů v membráně (jejich

delece vede ke snížení hladiny sfingolipidů o 5-25 %), na množství z glycerolu odvozených lipidů vliv nemají (Young et al., 2002).

Okolo Sur7 v *S. cerevisiae* existuje ještě mnoho neznámých, od topologie či přesné funkce proteinu po jeho roli v MCC. Jisté je, že nepřítomností Sur7 není výrazně narušena životaschopnost buněk, ani nedojde k zániku MCC/eisosomů, jako je tomu v případě Pil1 (Grossmann et al., 2008). Toto tvrzení však neplatí pro *Candida albicans*, u které absence Sur7 působí vážné defekty.

Podobně jako ScSur7 vytváří CaSur7 na plasmatické membráně shluky vlastnostmi podobné těm u *S. cerevisiae*, překvapivě se ale liší v reakci na myriocin. Při zablokování syntézy sfingolipidů dojde k rozrušení shluků CaSur7, ale protein stále zůstane přítomen na membráně (Alvarez et al., 2008). Podobně se u *S. cerevisiae* chová Nce102 (Fröhlich et al., 2009). CaSur7 je důležitý řadu buněčných funkcí, endocytózu, lokalizaci aktinu a septinů a zabraňuje vrůstání buněčné stěny do cytoplasmy, v *Δsur7* mutantu *C. albicans* pak tyto útvary připomínají eisosomální remnants pozorovatelné v *Δpil1* buňkách. Delece tohoto proteinu má také vliv na syntézu a integritu buněčné stěny a tvar hyf (Alvarez et al., 2008).

U *C. albicans* byly nalezeny pouze dva proteiny Sur7 rodiny: Sur7 a Fmp45. ScSur7 a CaSur7 sdílejí 44% sekvenční identitu, spolu s jejich homology se všechny proteiny Sur7 rodiny vyznačují přítomností evolučně striktně konzervovaného motivu (WxxW/YxxC(7-10 aa)C v první extracelulární smyčce. Tento motiv je podobný motivu, který můžeme najít u živočišných klaudinů, které se uplatňují například v těsných spojkách (tight junctions) (Alvarez et al., 2008).

Ca Sur7	WTFWGVCDKADYS--NC
Ca Fmp45	WTFYRMCGVDHNKNA-HC
Sc Sur7	WTFWGAQLQDKDGS-TC
Sc YNL194C	WYNYNWCGWESRGIAVNC
Sc Fmp45	WYNYNWCGYEDGQLA-NC
Sc YLR414C	IGLWSYCTVDSSHNIQSC
Claudin 1	EGLWMSCVSQSTGQI-QC

Obr. 6 : Srovnání sekvencí konzervovaného motivu v extracelulární smyčce proteinů Sur7 rodiny a klaudinu (převzato z Alvarez et al., 2008)

CaSur7 má také vliv na virulenci a invazivní růst. Buňky s deletovaným *SUR7* genem mají zvýšenou adhezi k povrchu a v menší míře produkují biofilm (Alvarez et al., 2008), mají slabší buněčnou stěnu s pozměněným složením (Wang et al., 2011), lépe se vyhýbají makrofágům, ale jsou méně efektivní v jejich zabíjení. Tyto buňky jsou také citlivější na různé chemikálie způsobující oxidativní poškození. Navíc mají sníženou schopnost vyvolat infekci (Douglas et al., 2012).

*C. albicans* je jeden z nejběžnějších houbových lidských patogenů, kandidózy mohou končit i smrtí. Většina antifungálních léčiv, jako například flukonazol, je cílena na

plasmatickou membránu. Vzhledem k tomu, že Sur7 není u savců konzervovaný protein, dala by se na něj potenciálně cílit nová léčiva (Douglas et al., 2012).

## Nce102

Nce102/Ypr149c je 173 aminokyselin dlouhý, 19 kDa velký MCC protein ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Bývá řazen mezi tetraspannery. Dále např. s živočišnými physiny, gyriny a ocludiny patří Nce102 mezi proteiny obsahující tzv. MARVEL doménu (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link). MARVEL doménu obsahující proteiny se vyskytují oblastech membrány bohatých na cholesterol, jako jsou těsné spoje nebo místa tvorby nových transportních váček, jejich přesná funkce však není známa (shrnuje v Douglas et al., 2013).

Na základě analýzy hydropatie byla pro Nce102 predikována struktura skládající se ze čtyř transmembránových helixů, C a N konec by se měly nacházet vně plasmatické membrány. Pokusy bylo však zjištěno, že oba konce jsou orientovány do cytoplasmy. Je zde také možnost, že protein neobsahuje čtyři transmembránové helixy, nýbrž pouze dva. Velký prostřední hydrofobní úsek by vůbec nemusel protínat membránu, nebo by mohl být do ní jenom částečně zanořen. Pokud by platil model s částečným zanořením (tedy vlásenkovitý tvar), měl by protein tvar podobný jako živočišné caveoliny, retikulony a flotiliny a mohl by mít funkci v navozování ohybu membrány (Loibl et al., 2010; Stradalova et al., 2009). Definitivní topologii proteinu by mohla určit krystalografická analýza, která však zatím není k dispozici.

Na plasmatické membráně vytváří Nce102 podobný vzor jako Sur7, se kterým z velké části kolokalizuje do MCC, zároveň se ale podstatná frakce Nce102 vyskytuje rozptýleně i ve zbytku membrány. Podobně jako Sur7 se také částečně hromadí v eisosomálních remnants v *Δpil1* buňkách. Ačkoliv v *Δnce102* buňkách Sur7 také vytváří, i když méně uniformní, shluky, protonové symportéry (Can1, HUP1) jsou homogenněji rozprostřeny po celé ploše membrány (Grossmann et al., 2008; Fröhlich et al., 2009). Na snímcích z elektronového mikroskopu byl také pozorován vliv Nce102 na vznik invaginací. Při absenci proteinu byly na povrchu buněk pozorovány ploché, hladké, prodloužené oblasti porovnatelné s morfologií žlábků vyskytujících se v divokém kmeni (Stradalová et al., 2009; Loibl et al., 2010). Všechny výše zmíněné fenotypy lze dosáhnout také delecí posledních šesti aminokyselin z C konce Nce102, které jsou evolučně velmi konzervované a které jsou zodpovědné za směřování Nce102 do MCC (Loibl et al., 2010).

Fhn1/Ygr131w je jeden z nejbližších homologů Nce102, sdílí s ním 55% sekvenční identitu. Při overexpressi dokáže plně napravit *Δnce102* fenotyp včetně hromadění permeáz do MCC. Proteinů sdílejících významnou homologii s Nce102 je více. BLASTem bylo nalezeno více než 40 Nce102 homologů. Funkční je dokonce nahrazení Nce102 proteinem fhn1/SPBC1685.13 (functional homolog of *S. cerevisiae* NCE102) z fylogeneticky vzdálené *Schizosaccharomyces pombe*. Ačkoliv tento protein vykazuje pouze nízký stupeň homologie s Nce102, dokáže komplementovat jeho delecii v *S. cerevisiae*. Funkce Nce102 v organizaci plasmatické membrány by tedy mohla být konzervována napříč kmenem *Ascomycota* (Loibl et al., 2010).

Nce102 hraje důležitou roli ve sfingolipidové signalizaci. Chová se jinak než jiné MCC proteiny, svou pozici v membráně mění na základě změn hladiny sfingolipidů. Protein není nezbytný pro syntézu sfingolipidů, ale zdá se, že by mohl fungovat jako senzor citlivě reagující na změnu jejich hladin a při jejich dostatečném množství se přesouvá do MCC. Nce102 by také mohl lineárně inhibovat Pkh kinázy a zároveň negativně regulovat fosforylaci Pil1. Pro tento model platí, že pokud je tedy hladina sfingolipidů nízká (například zablokování syntézy myriocinem), vyputuje Nce102 z MCC, tím přestane inhibovat Pkh1/2, které fosforylují Pil1 a to způsobí rozpad eisosomů (Fröhlich et al., 2009).

Dalšími pokusy bylo zjištěno, že Nce102 při nedostatku sfingolipidů interaguje s proteinem Sng1. Sng1 je transmembránový protein plasmatické membrány vyskytující se mimo MCC, který stimuluje Pkh/Ypk signalizaci a který je důležitý pro chladové adaptace plasmatické membrány. Při nízké hladině sfingolipidů Nce102 interaguje s Sng1 a inhibice zbavené Pkh kinázy mohou fosforylovat Ypk. Nce102 spolu s Sng1 by zde mohly mít úlohu proteinového lešení a fyzicky tak přibližovat komponenty signalizace. Jestli Nce102 a Sng1 interagují s kinázami přímo, nebo jestli se procesu účastní více proteinů, není známo, zdá se také, že ovlivňují výskyt proteinů, které jsou cíli Pkh/Ypk signalizace (García-Marqués et al., 2016).

Buňky neschopné syntézy hemu (*Δhem15*) nejsou schopné syntetizovat mitochondriální cytochromy, tudíž nemají funkční respirační řetězec a jsou odkázány na fermentaci. Bylo zjištěno, že po přidání exogenního heminu (oxidovaný hem) dokáže *Δhem15* fenotyp napravit mutovaný Nce102. Byly nalezeny dvě varianty mutovaného proteinu, obě se vyznačovaly bodovými missense mutacemi v predikovaných transmembránových helixech (A<sup>125</sup>E, G<sup>22</sup>R). Mechanismus toho jevu není znám, zdá se však, že mutovaný Nce102 má při internalizaci heminu pravděpodobně spíše úlohu v endocytóze, než že by se přímo podílel na pumpování heminu do cytosolu. Ačkoliv mutovaný Nce102 lokalizuje také do MCC, není



schopný, oproti své nemutované variantě, udržet v MCC Fur4 (a pravděpodobně i ostatní MCC permeázy). Jedno z možných vysvětlení by pak mohlo být, že neznámý protein zprostředkovávající internalizaci hemu hraje také roli v endocytóze Fur4 (Kim et al., 2016).

## Závěr

---

Uplynulo 15 let od prvního pozorování MCC pomocí fluorescenčně značeného Sur7, a ačkoliv bylo získáno o MCC/eisosomech velké množství poznatků, jsou komponenty tohoto kompartmentu a jejich funkce z velké části stále neznámé.

Ke dnešnímu dni máme představu o proteinovém a lipidovém složení MCC, funkci a interakcích některých eisosomálních proteinů, ovšem o vzniku těchto domén víme pramálo. MCC slouží mimo jiné i jako sklad nadbytečné membrány a jsou tedy schopné rychle odpovídat na změny podmínek vnějšího prostředí zvětšením, nebo zmenšením objemu buňky, můžeme zde vidět jistou analogii s živočišnými kaveolami.

Stále není známa přesná funkce Sur7 v rámci MCC, ale jedná se spíše o strukturní protein. Tomuto tvrzení napovídá fakt, že overexprimovaný Sur7 v *Δrvs* buňkách vede k částečně normální organizaci buňky a že jeho absence u *C. albicans* vede k morfologicky abnormálním buňkám. Konzervovaný Cys-motiv v první extracelulární smyčce můžeme najít u živočišných klaudinů, které se uplatňují v těsných spojkách. Zde se nabízí otázka, zda-li by se Sur7 nemohl účastnit obdobných extracelulárních interakcí.

Nce102 by naopak mohl mít spíše regulační funkci, neboť pravděpodobně ovlivňuje Pkh kinázy, které pak interagují s dalšími kinázami účastnícími se různých buněčných odpovědí. Ačkoliv o jeho topologii se dá pouze spekulovat, jeden z modelů ukazuje, že by Nce102 mohl mít vlásenkovitý tvar jako živočišné kaveoliny. Tento tvar by proteinu umožnil navozovat ohyb membrány, tudíž by se tento protein mohl účastnit jednoho z prvních kroků vzniku invaginace, v tomto případě by Nce102 měl i strukturní funkci.

Plasmatická membrána zůstává i nadále málo prozkoumaná, přesto je další výzkum v této oblasti důležitý nejen pro porozumění buněčné adaptace na různé stresy. Nové poznatky jsou také důležité pro vývoj nových účinných antifungálních léčiv, jejichž nedostatek by v budoucnu mohl představovat problém.

## Použitá literatura

---

Alvarez, F. J., Douglas, L. M., Rosebrock, A., & Konopka, J. B. (2008). The Sur7 Protein Regulates Plasma Membrane Organization and Prevents Intracellular Cell Wall Growth in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5214–5225.

Berchtold, D., & Walther, T. C. (2009). TORC2 Plasma Membrane Localization Is Essential for Cell Viability and Restricted to a Distinct Domain. *Molecular Biology of the Cell*, 20(5), 1565–75

Brach T, Specht T, Kaksonen M (2011). Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J Cell Sci* 124, 328–337.

Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T, Thorner J, Alessi DR. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* 9: 186–197

\*Douglas LM, Konopka JB. (2014). Fungal membrane organization: the eisosome concept. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:377-93.

Douglas, L. M., Wang, H. X., Keppler-Ross, S., Dean, N., & Konopka, J. B. (2012). Sur7 Promotes Plasma Membrane Organization and Is Needed for Resistance to Stressful Conditions and to the Invasive Growth and Virulence of *Candida albicans*. *mBio*, 3(1), e00254–11.

Douglas, L. M., Wang, H. X., & Konopka, J. B. (2013). The MARVEL Domain Protein Nce102 Regulates Actin Organization and Invasive Growth of *Candida albicans*. *mBio*, 4(6), e00723–13.

Dupont S, Beney L, Ritt JF, Lherminier J, Gervais P. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim Biophys Acta.* 2010 May;1798(5):975-85.

Fröhlich, F., Moreira, K., Aguilar, P. S., Hubner, N. C., Mann, M., Walter, P., & Walther, T. C. (2009). A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *The Journal of Cell Biology*, 185(7), 1227–1242.

Fröhlich, F., Christiano, R., Olson, D. K., Alcazar-Roman, A., DeCamilli, P., & Walther, T. C. (2014). A role for eisosomes in maintenance of plasma membrane phosphoinositide levels. *Molecular Biology of the Cell*, 25(18), 2797–2806.

García-Marqués S, Randez-Gil F, Dupont S, Garre E, Prieto JA. Sng1 associates with Nce102 to regulate the yeast Pkh-Ypk signalling module in response to sphingolipid status. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1863(6 Pt A):1319-33.

Ghaemmaghami, S., W.K. Huh, K. Bower, R.W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E.K. O'Shea, and J.S. Weissman. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 425:737–741.

Grossmann, G., M. Opekarová, J. Malínsky, I. Weig-Meckl, and W. Tanner. 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J*. 26:1–8.

Grossmann, G., J. Malínsky, W. Stahlschmidt, M. Loibl, I. Weig-Meckl, W.B. Frommer, M. Opekarová, and W. Tanner. 2008. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 183:1075–1088.

Grousl, T., Opekarová, M., Stradalova, V., Hasek, J., & Malinsky, J. (2015). Evolutionarily Conserved 5'-3' Exoribonuclease Xrn1 Accumulates at Plasma Membrane-Associated Eisosomes in Post-Diauxic Yeast. *PLoS ONE*, 10(3), e0122770.

Kabeche, R., Baldissard, S., Hammond, J., Howard, L., & Moseley, J. B. (2011). The filament-forming protein Pil1 assembles linear eisosomes in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 22(21), 4059–4067.

Kabeche, R., Howard, L., & Moseley, J. B. (2015). Eisosomes provide membrane reservoirs for rapid expansion of the yeast plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 128(22), 4057–4062.

Kabeche, R., Madrid, M., Cansado, J., & Moseley, J. B. (2015). Eisosomes Regulate Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) Cortical Clusters and Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Signaling upon Osmotic Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 25960–25973.

Kamble C, Jain S, Murphy E, Kim K. Requirements of Slm proteins for proper eisosome organization, endocytic trafficking and recycling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci.* 2011 Mar;36(1):79-96.

Karotki, L., Huiskonen, J. T., Stefan, C. J., Ziółkowska, N. E., Roth, R., Surma, M. A., ... Walther, T. C. (2011). Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *The Journal of Cell Biology*, 195(5), 889–902.

Kim HJ, Jeong MY, Parnell TJ, Babst M, Phillips JD, Winge DR. The Plasma Membrane Protein Nce102 Implicated in Eisosome Formation Rescues a Heme Defect in Mitochondria. *J Biol Chem.* 2016 Aug 12;291(33):17417-26.

Michael M. Lacy, David Baddeley, Julien Berro. (2016). New single-molecule imaging of the eisosome BAR domain protein Pil1p reveals filament-like dynamics. *bioRxiv preprint first posted online Dec. 8, 2016*

Lemetais G, Dupont S, Beney L, Gervais P. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Oct;96(2):471-80.

Loibl, M., Grossmann, G., Stradalova, V., Klingl, A., Rachel, R., Tanner, W., ... Opekarová, M. (2010). C Terminus of Nce102 Determines the Structure and Function of Microdomains in the *Saccharomyces cerevisiae* Plasma Membrane . *Eukaryotic Cell*, 9(8), 1184–1192.

Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O. N., & Dickson, R. C. (2008). The Sphingolipid Long-chain Base-Pkh1/2-Ypk1/2 Signaling Pathway Regulates Eisosome Assembly and Turnover. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10433–10444.

Luo, G., Costanzo, M., Boone, C., & Dickson, R. C. (2011). Nutrients and the Pkh1/2 and Pkc1 Protein Kinases Control mRNA Decay and P-body Assembly in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 8759–8770.

Malínská, K., Malínský, J., Opekarová, M., & Tanner, W. (2003). Visualization of Protein Compartmentation within the Plasma Membrane of Living Yeast Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 14(11), 4427–4436.

Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci.* 2004 Dec 1;117(Pt 25):6031-41.

Moor, H., & Mühlethaler, K. (1963). FINE STRUCTURE IN FROZEN-ETCHED YEAST CELLS. *The Journal of Cell Biology*, 17(3), 609–628.

Moreira, K. E., Walther, T. C., Aguilar, P. S., & Walter, P. (2009). Pil1 Controls Eisosome Biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 20(3), 809–818.

Moreira, K. E., Schuck, S., Schrul, B., Fröhlich, F., Moseley, J. B., Walther, T. C., & Walter, P. (2012). Seg1 controls eisosome assembly and shape. *The Journal of Cell Biology*, 198(3), 405–420.

Olivera-Couto, A., Graña, M., Harispe, L., & Aguilar, P. S. (2011). The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 22(13), 2360–2372.

Robl I, Grassl R, Tanner W, Opekarová M. Properties of a reconstituted eukaryotic hexose/proton symporter solubilized by structurally related non-ionic detergents: specific requirement of phosphatidylcholine for permease stability. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Feb 15;1463(2):407-18.

Seger S, Rischatsch R, Philippsen P. Formation and stability of eisosomes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *J Cell Sci.* 2011 May 15;124(Pt 10):1629-34.

Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature.* 1986 Feb 20-26;319(6055):689-93.

Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972 Feb 18;175(4023):720-31.

Sivadon P, Peypouquet MF, Doignon F, Aigle M, Crouzet M. Cloning of the multicopy suppressor gene SUR7: evidence for a functional relationship between the yeast actin-binding protein Rvs167 and a putative membranous protein. *Yeast.* 1997 Jun 30;13(8):747-61.

Spira F, Mueller NS, Beck G, von Olshausen P, Beig J, Wedlich-Söldner R. Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol.* 2012 Apr 29;14(6):640-8.

Strádalová V, Stahlschmidt W, Grossmann G, Blazíková M, Rachel R, Tanner W, Malinsky J. Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci.* 2009 Aug 15;122(Pt 16):2887-94.

Stradalova, V., Blazikova, M., Grossmann, G., Opekarová, M., Tanner, W., & Malinsky, J. (2012). Distribution of Cortical Endoplasmic Reticulum Determines Positioning of Endocytic Events in Yeast Plasma Membrane. *PLoS ONE*, 7(4), e35132.

Thayer, N. H., Leverich, C. K., Fitzgibbon, M. P., Nelson, Z. W., Henderson, K. A., Gafken, P. R., ... Gottschling, D. E. (2014). Identification of long-lived proteins retained in cells undergoing repeated asymmetric divisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(39), 14019–14026.

Vangelatos, I., Roumelioti, K., Gournas, C., Suarez, T., Scazzocchio, C., & Sophianopoulou, V. (2010). Eisosome Organization in the Filamentous Ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 9(10), 1441–1454.

Vaskovicova K, Stradalova V, Efenberk A, Opekarova M, Malinsky J. (2014). Assembly of fission yeast eisosomes in the plasma membrane of budding yeast: import of foreign membrane microdomains. *Eur J Cell Biol.* 2015 Jan;94(1):1-11.

Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439: 998–1003.

Walther, T. C., Aguilar, P. S., Fröhlich, F., Chu, F., Moreira, K., Burlingame, A. L., & Walter, P. (2007). Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *The EMBO Journal*, 26(24), 4946–4955.

Wang, H. X., Douglas, L. M., Aimaganianda, V., Latgé, J.-P., & Konopka, J. B. (2011). The *Candida albicans* Sur7 Protein Is Needed for Proper Synthesis of the Fibrillar Component of the Cell Wall That Confers Strength . *Eukaryotic Cell*, 10(1), 72–80.

\*Ziółkowska NE, Christiano R, Walther TC. Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol.* 2012 Mar;22(3):151-8.

\* označují sekundární zdroje